

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—204159

⑤ Int. Cl.³
C 07 C 103/52

識別記号
1 0 7

庁内整理番号
6464—4H

④ 公開 昭和59年(1984)11月19日

発明の数 1
審査請求 未請求

Dai-ichi Chem. Ind.

(全 6 頁)

④ [Met(O)^{8,18}]hPTH—(1—34) ペプチド

東京都文京区小石川4丁目20—5—1005

② 特 願 昭58—75607

⑦ 発 明 者 松本俊夫

② 出 願 昭58(1983)4月28日

東京都中野区松が丘1丁目30—1—202

⑦ 発 明 者 葛木茂夫

⑦ 発 明 者 尾形悦郎

静岡県田方郡伊豆長岡町長岡46
5の3

東京都世田谷区岡本町1丁目30—23

⑦ 発 明 者 森田香

① 出 願 人 東洋醸造株式会社

静岡県田方郡大仁町三福632番
地の1

静岡県田方郡大仁町三福632番
地の1

⑦ 発 明 者 松永浩

明 細 書

1. 発明の名称

[Met(O)^{8,18}]hPTH—(1—34)
ペプチド

2. 特許請求の範囲

1)、式

H—Ser—Val—Ser—Glu—Ile—Gln—
Leu—Met(O)—His—Asn—Leu—Gly—
Lys—His—Leu—Asn—Ser—Met(O)—
Glu—Arg—Val—Glu—Trp—Leu—
Arg—Lys—Lys—Leu—Gln—Asp—
Val—His—Asn—Phe—OH

で表わされるペプチドまたはその塩。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新規なヒト副甲状腺ホルモン(hPTH)ペプチド誘導体に関する。さらに詳しくは、本発明は[Met(O)^{8,18}]hPTH—(1—34)ペプチドまたはその塩である。上記ペプチドは、式

H—Ser¹—Val²—Ser³—Glu⁴—Ile⁵—Gln⁶—

Leu⁷—Met(O)⁸—His⁹—Asn¹⁰—Leu¹¹—Gly¹²—
Lys¹³—His¹⁴—Leu¹⁵—Asn¹⁶—Ser¹⁷—Met(O)¹⁸—
Glu¹⁹—Arg²⁰—Val²¹—Glu²²—Trp²³—Leu²⁴—
Arg²⁵—Lys²⁶—Lys²⁷—Leu²⁸—Gln²⁹—Asp³⁰—
Val³¹—His³²—Asn³³—Phe³⁴—OH [1]

で表わされ、公知のhPTH—(1—34)ペプチド[Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 384 (1974)、Endocrinology, 98, 1294 (1976)、Hoppe—Seyler's Z. Physiol. Chem., 335, 415 (1974)]の8位および18位のメチオニン(Met)が酸化された誘導体である。

hPTHは84ケのアミノ酸よりなるポリペプチドで、その生物学的活性は、血中カルシウム上昇作用、血中リン低下作用、尿中カルシウム低下作用、尿中リン上昇作用、尿中C—AMP上昇作用、腎でのビタミンDの1位水酸化酵素活性の上昇などの作用を有するが、hPTH—(1—34)ペプチドは、これらのすべての作用を併せもつ。

しかしながら、本発明の $[Met(O)^{a, 18}] hPTH-(1-34)$ ペプチドは上記各作用のうち尿中カルシウム低下作用のみを有し、他の作用を有しない特徴を有し、尿中カルシウム低下作用のみを必要とする病症に有用な物質である。

本発明のペプチド[1]は、その方法の条件により塩基またはその塩の形で得られる。塩としては無機酸塩、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩である。また本ペプチド[1]はある種の無機物質または有機物質を付加して錯体を形成し得る。この錯体とは、添加した時に生成し、ペプチドに持続作用を与える化合物を意味する。

本発明のペプチド[1]を製造するには、公知の $hPTH-(1-34)$ ペプチド [Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 335, 415, (1974)] を水溶液中、緩やかな酸化剤、例えば過酸化水素水で酸化することにより行われる。上記の酸化反応は、通常室温で充分に進行する。得られた反応液

にメチルエステル基、ベンジルエステル基を用い、側鎖のカルボキシル基の保護にベンジルエステル基を用い、セリンの水酸基の保護にベンジル基を用い、アルギニンのグアニジノ基中のアミノ基の保護にメシチレン-2-スルホニル基を用いるのが好ましい。

本目的化合物[1]の合成においては、個々のアミノ酸および(または)低級ペプチドの縮合は、例えば、保護された α -アミノ基および活性化末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドと遊離の α -アミノ基および保護された末端カルボキシル基をもつアミノ酸またはペプチドとを反応させることにより実施することができる。

この場合、カルボキシル基は、例えば酸アジド、酸無水物、酸イミダズリドまたは活性エステル、例えばシアノメチルエステル、 p -ニトロフェニルエステル、 N -ヒドロキシコハク酸イミドエステル、2, 4, 5-トリクロロフェニルエステルなどに変換することによつて活性化することができる。またカルボジイミド、例えば N , N' -ジシ

クロヘキシルカルボジイミド、 N -エチル- N' -3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、 N , N' -カルボニルジイミダゾール、イソオキゾリウム塩、例えばウッドワード反応剤などの縮合剤を使用して反応させることによつて活性化することができる。

また、本発明のペプチド[1]は、式[1]で示されるアミノ酸順序に個々の保護されたアミノ酸および(または)保護された低級ペプチドを液相合成法により縮合し、縮合反応の最終段階で N 末端のアミノ基の保護基および側鎖の官能基の保護基を酸分解により脱離する別法によつても得られる。縮合反応自体はペプチド合成のための常法手段に従つて、保護基の脱離、縮合反応を繰り返すことにより行われる。即ち、本ペプチド[1]の原料ならびにすべての中間体の製造において使用される各種保護基はペプチド合成で既知な保護基が用いられる。このような保護基はペプチド合成化学の分野の文献ならびに参考書に記載されている、例えば、 α -アミノ基の保護に t -ブチルオキシカルボニル基を用い、 N 末端の α -アミノ基の保護にベンジルオキシカルボニル基を用い、リジンの ϵ -アミノ基の保護に O -クロロベンジルオキシカルボニル基を用い、 α -カルボキシル基の保護

クロヘキシルカルボジイミド、 N -エチル- N' -3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、 N , N' -カルボニルジイミダゾール、イソオキゾリウム塩、例えばウッドワード反応剤などの縮合剤を使用して反応させることによつて活性化することができる。

本発明において好ましい縮合方法は、アジド法、活性エステル法、ピュンシュ法 [Z. Naturforsch., 21b, 426 (1966)] またはガイガー法 [Chem. Ber., 103, 788 (1970)] などを用いるのが適する。縮合順序は式[1]で示されるアミノ酸順序であれば、如何なる順序からも合成し得るが、 C 末端側から順次アミノ酸および(または)ペプチドを連結させるのが好ましい。

メチオニンはそれ自体で酸化してから使用してもよいし、メチオニンを含む適当なペプチドフラグメントを得た段階で酸化してもよい。

上記の縮合反応における α -アミノ基の保護基、例えば t -ブチルオキシカルボニル基はトリフルオロ酢酸で脱離される。 α -カルボキシル基の保

酸基、例えばメチルエステルはこれを希薄な水酸化ナトリウム溶液で分解し、またはヒドウィチドあるいはトリクロロエトキシカルボニルヒドウィチドのような保護ヒドウィチドに変えることができる。

こうして保護されたN末端α-アミノ基、ε-アミノ基、C末端カルボキシ基、側鎖カルボキシ基、グアニジノ基および(または)水酸基を有するテトラトリアコンタペプチドが得られる。これらの保護基は、好ましくは酸分解、例えば無水弗化水素によつて一段階で脱離される。

このようにして得られたペプチド[1]は、ペプチドまたは蛋白質を精製する公知の手段によつて分離精製することができる。例えば、セファデックスG-25、セファデックスG-50、セファデックスLB-20などのゲル濾過剤を用いるゲル濾過、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィーなどにより行うことができる。

次に、本発明のペプチド[1]の生物学的活性について述べる。

(2) 測定結果

h P T H - (1 - 3 4) における血中カルシウム、リン、尿中カルシウム、リンおよびC - A M P を測定した結果は、第1図の通りであつて、血中カルシウム上昇作用、血中リン低下作用、尿中カルシウム低下作用、尿中リン上昇作用および尿中C - A M P 上昇作用を有する。これに対し[Met(O)^{8, 18}] h P T H - (1 - 3 4) における血中カルシウム、リン、尿中カルシウム、リンおよびC - A M P を測定した結果は、第2図の通りであつて、尿中カルシウム低下作用のみを有し、他の作用を有しない特徴を有する。

(2) h P T H - (1 - 3 4) および[Met(O)^{8, 18}] h P T H - (1 - 3 4) の腎における25-ヒドロキシビタミンD₃-1位水酸化酵素に及ぼす影響

① 試験方法

体重50gのウイスターラット(オス)をビタミンD欠乏食(0.45%カルシウム、0.3%リンを含む)にて飼育し、6週目にベントバルビター

(1) h P T H - (1 - 3 4) および[Met(O)^{8, 18}] h P T H - (1 - 3 4) の血中カルシウム、リン、尿中カルシウム、リンおよびC - A M P に及ぼす影響

① 試験方法

標準食で飼育した体重300gのSprague - Dawley (S. D.) ラット(オス)の大腿動脈にカニユーレを挿入し、4%グルコース、5 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂、20 mM NaCl、2.5 mM KClを含む栄養液を3 ml/時間の速度で各々h P T H - (1 - 3 4) ペプチドおよび[Met(O)^{8, 18}] h P T H - (1 - 3 4) ペプチド2 μg/時間と共に持続的に注入した。両ペプチドの投与は各1時間行い、血中および尿中のカルシウム濃度は原子吸光計(日立208)で測定し、血中および尿中の無機リン量はGoldenberg および Fernandezの方法[*Clinical Chemistry*, 12, 871(1966)]で測定し、また尿中のC - A M P はHonmaらの方法[*Biochem. Med.*, 18, 257(1977)]で測定した。

ル(50 mg/kg体重)を静脈注射して麻酔させ、甲状腺、副甲状腺摘除術を行つた。次に左大腿動脈にカニユーレを挿入し、前記栄養液を3 ml/時間の速度で各々h P T H - (1 - 3 4) および[Met(O)^{8, 18}] h P T H - (1 - 3 4) 1.5 μg/時間と共に持続的に注入した。両ペプチドの投与は各1時間行い、注入開始24時間後に[³H]25-ヒドロキシビタミンD₃(9 Ci/mM)0.5 μCiを静注し、その6時間後に大腿動脈カニユーレより採血した。血液は血漿分離し、Bligh および Dyerの方法[*Can. J. Biochem. physiol.*, 37, 911(1959)]に従い、血中[³H]1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃の量を求めた。

② 測定結果

測定した結果は第1表の通りであつて、h P T H - (1 - 3 4) は腎でのビタミンDの1位水酸化酵素活性の上昇作用を有するが、[Met(O)^{8, 18}] h P T H - (1 - 3 4) は上記作用を有しない。

第 1 表

被 験 薬	$[^3\text{H}]$ 1, 25 - ジヒドロ キシビタミン D_3 (pM/100ml)
無 添 加	12.2 ± 0.6
h P T H-(1-34)	27.5 ± 2.8
$[\text{Met}(\text{O})^{8,18}]$ h P T H-(1-34)	14.4 ± 1.3

次に、実施例を挙げて本発明の製造例について述べる。

実施例 1

$[\text{Met}(\text{O})^{8,18}]$ h P T H-(1-34) :

H - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln -
Leu - Met(O) - His - Asn - Leu - Gly -
Lys - His - Leu - Asn - Ser - Met(O) -
Glu - Arg - Val - Glu - Trp - Leu - Arg
- Lys - Lys - Leu - Gln - Asp - Val -
His - Asn - Phe - OH

解) : Asp 1.25 (1)、Asn 3.29 (3)、Ser
2.82 (3)、Glu 3.00 (3)、Gln 1.27 (2)、Gly
1.26 (1)、Val 3.27 (3)、Met (O) 2.57 (2)、
Ile 1.15 (1)、Leu 5.00 (5)、Phe 1.10 (1)、
Lys 3.22 (3)、His 2.35 (3)、Arg 1.90 (2)、
Trp 0.71 (1)

薄層クロマトグラフィー〔担体：メルク社製セルロース、展開溶媒：ブタノール-ピリジン-酢酸-水 (15 : 10 : 3 : 12) ; Rf = 0.50
〔h P T H-(1-34) ; Rf = 0.59〕

4. 図面の簡単な説明

第1図は公知のh P T H-(1-34)ペプチドの血中カルシウム、血中リン、尿中カルシウム、尿中リンおよび尿中C - A M Pに及ぼす影響を示す曲線を表わし、第2図は本発明の $[\text{Met}(\text{O})^{8,18}]$ h P T H-(1-34)ペプチドの血中カルシウム、血中リン、尿中カルシウム、尿中リンおよび尿中C - A M Pに及ぼす影響を示す曲線を表わす。

特許出願人

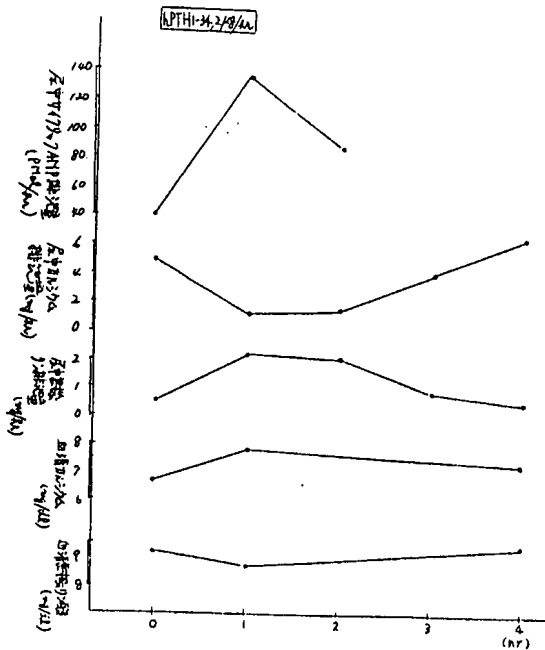
東洋醸造株式会社
代表者 高田哲男

h P T H-(1-34) ; H - Ser - Val - Ser
- Glu - Ile - Gln - Leu - Met - His - Asn -
Leu - Gly - Lys - His - Leu - Asn - Ser -
Met - Glu - Arg - Val - Glu - Trp - Leu -
Arg - Lys - Lys - Leu - Gln - Asp - Val -
His - Asn - Phe - OH 10 mgを水2.5 mlに溶かし、これに約1%過酸化水素水250 μL を加え、37℃で30分間攪拌した。反応液に水2.25 mlを加え凍結乾燥して $[\text{Met}(\text{O})^{8,18}]$ h P T H-(1-34)を得た。収量

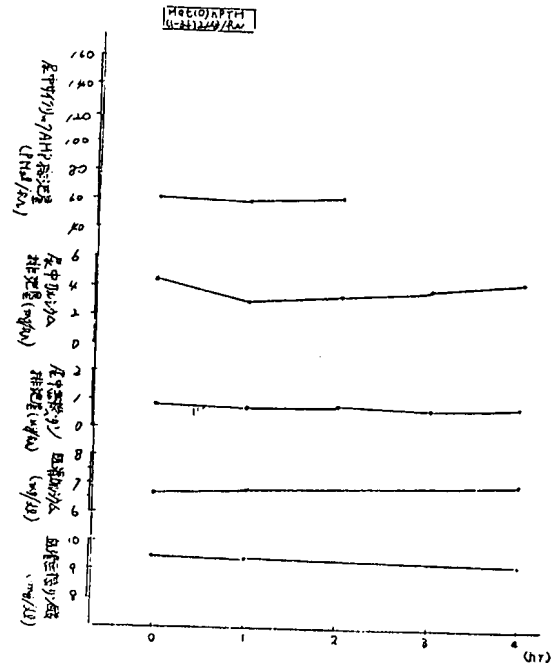
アミノ酸分析 ;

- (1) 酸加水分解 (2%チオグリコール酸を含む6 N塩酸0.5 mlでの105℃、24時間加水分解) ; Asp 4.11 (4)、Ser 2.46 (3)、Glu 5.10 (5)、Gly 1.02 (1)、Val 2.83 (3)、Met 1.97 (2)、Ile 0.97 (1)、Leu 5.00 (5)、Phe 0.95 (1)、Lys 3.11 (3)、His 2.44 (3)、Arg 1.97 (2)、Trp 0.85 (1)
- (2) 酵素分解 (トリプシンで37℃、1時間、アミノペプチダーゼMで37℃、24時間酵素分

第 1 図



第 2 図



手 続 補 正 書

昭和58年7月8日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和58年特許願第75607号

2. 発明の名称

[Met(O)^{8,16}]hPTH-(1-34)ペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

名称 東 洋 醸 造 株 式 会 社

代表者 高 田 哲 男

4. 補正命令の日付

自 発

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

明細書第3頁第20行の

「進行する。」を

「進行する。」と訂正する。

明細書第7頁第2行の

「ヒドウチド」を

「ヒドラチド」と訂正する。

明細書第8頁第14行の

「原子」を

「原子」と訂正する。

明細書第10頁第8行の

「(9ci/mm)」を


「(9Ci/mm)」と訂正する。

明細書第12頁第11行の

「アミノ酸分析；」を

「アミノ酸分析；0.01」と訂正する。

手 続 補 正 書

昭和59年  15日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

「ナトリウム溶液で分解し、」を

「ナトリウム溶液で分解して遊離のカルボキシル
基にできる。」と補正する。

1. 事件の表示

昭和58年特許願第75607号

~~同第7頁第2行の~~

~~「ヒドロキシル」を~~

2. 発明の名称

(Me₆(O)^{8,18}) h P T H - (ノ-34)

~~「ヒドロキシル」を補正する。~~


ペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三福632番地

の /

名称  東 洋 醸 造 株 式 会 社

代表者 高 田 哲

4. 補正命令の日付

(自発)

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

明細書第7頁第2行の